

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Tentang Apel

2.1.1 Klasifikasi Tanaman Apel

Dalam ilmu botani apel disebut *Malus sylvestris* Mill. Apel merupakan tanaman buah tahunan yang berasal dari daerah Asia Barat dan hidup pada iklim subtropis. Di Indonesia apel telah ditanam sejak tahun 1934 hingga saat ini. (Suhardjo, 1985).

Menurut sistematika, tanaman apel termasuk dalam:

- Divisio : Spermatophyta
- Subdivisio : Angiospermae
- Klas : Dicotyledonae
- Ordo : Rosales
- Famili : Rosaceae
- Genus : Malus
- Spesies : *Malus sylvestris* Mill

Dari spesies *Malus sylvestris* Mill ini, ada bermacam-macam varietas yang mempunyai ciri-ciri atau karakteristik khas tersendiri. Beberapa varietas apel yang termasuk unggulan antara lain: Rome Beauty, Manalagi, Anna, Princess Noble dan Wangli/Lali jiwo. Apel memiliki kandungan banyak vitamin C serta vitamin B. Selain itu para pelaku diet menjadi pilihan untuk melakukan diet sebagai ganti makanan substitusi (Prihatman, 2000).



Gambar 2.1 Apel (*Malus sylvestris* Mill)

2.1.2 Daerah Asal Dan Penyebarannya

Apel (*Malus sylvestris* Mill) adalah tanaman tahunan yang berasal dari daerah subtropis (Untung, 1994). Di Indonesia tanaman ini sudah mulai ada dari tahun 1934 dan dapat berbuah dengan baik (Soelarso, 1997). Tanaman apel kemungkinan adalah tumbuhan yang awalnya merupakan tanaman yang dibudidayakan oleh petani. Setiap buah apel diperbaiki dalam arti dipilih melalui proses seleksi dalam kurun waktu yang cukup lama. Adapun sedikit sejarah mengenai apel, yaitu Iskandar Agung menemukan tumbuhan apel kerdil di Asia pada tahun 300 SM. Pada akhir musim gugur apel akan dipetik dan disimpan didalam suhu yang hampir melebihi titik beku, apel ini biasa disebut dengan apel musim dingin. Apel musim dingin ini telah menjadi makanan penting di Asia, Argentina, Amerika Serikat dan Eropa sejak lama (Kurniawan, 2014).

Tanaman apel dapat tumbuh subur di daerah yang memiliki temperatur udara yang dingin atau sejuk. Di Eropa tanaman apel dibudidayakan terutama di daerah subtropis bagian utara, sedangkan di Indonesia apel lokal yang terkenal berasal dari daerah Malang, Jawa Timur. Biasanya disebut sebagai apel Malang serta ada apel lokal yang berasal dari daerah Gunung Pangrango, Jawa Barat. Tanaman apel dapat tumbuh hidup dan berkembang dengan baik di Indonesia apabila dibudidayakan di daerah yang mempunyai dataran tinggi dengan ketinggian sekitar 700 – 1200 meter diatas permukaan air laut (Sufrida, 2006).

Di Indonesia, daerah sentra produksi apel yang terbesar adalah Kabupaten Malang (Batu dan Poncokusumo) dan Pasuruan (Nongkojajar), Jawa Timur. Di daerah tersebut sejak tahun 1950 tanaman apel mulai dibudidayakan. Di Indonesia tanaman apel berkembang sejak diperkenalkannya teknik dalam menanam tanaman apel yaitu teknologi perompesan daun yang diikuti pelengkungan cabang, sehingga saat tanaman berbuah dapat diatur menurut kemauan penanamannya. Teknik tanam perompesan daun ini juga berfungsi selama sebagai pengganti suhu rendah dimana hal tersebut merupakan syarat utama pemecahan masa dormansi di daerah iklim sedang. Faktor teknis dan ekonomis yang menguntungkan menyebabkan adanya peningkatan komoditas apel di Indonesia. Akhirnya selama tahun 1984-1988 komoditas apel di Jawa Timur berkembang pesat. Pada tahun 1984 ada 7.303.327 pohon apel yang berkembang

menjadi 9.046.276 pohon apel pada tahun 1988, atau peningkatan komoditas apel di Jaa Timur rata-rata per tahun sekitar 4,07 %. Sedangkan produksinya meningkat 17,50 % per tahun (Soelarso, 1997).

2.1.3 Morfologi Tanaman Apel

Dari spesies *Malus sylvestris* Mill ini terdapat bermacam-macam varietas yang pada umumnya tidak tampak berbeda ditinjau dari morfologinya (Soelarso, 1997). Pohon apel tingginya 3-12 meter sehingga termasuk ke dalam kategori pohon kecil. Setiap pohon apel bisa menghasilkan 7,5 Kg buah setiap kali musim berbuah. Buah apel memiliki aroma yang wangi (Hamidah, 2016). Pori kulitnya jarang-jarang . Rasanya manis dan tidak berasa asam walaupun belum matang. Daging buahnya berwarna putih, sedikit air dan teksturnya agak liat. Bentuk bijinya bulat pendek dan berwarna coklat tua. Produksi buah rata – rata tiap pohonnya sekitar 75 kg per musim (Sufrida, 2006).

Tanaman apel ada yang berasal dari biji dan anak-anakan yang membentuk akar tunggang, yaitu akar yang akan tumbuh lurus atau vertical menuju kedalam tanah. Akar tunggang berfungsi sebagai penegak tanaman, untuk menembus lapisan tanah yang keras, serta penghisap air dan unsure hara dalam tanah. Kesuburan tanah dan tekstur dari tanah sebagai media tanam sangat mempengaruhi seberapa dalam dan luas penyebaran akar tersebut. Pada tanah yang tidak subur, maka akar akan menembus jauh lebih dalam kedalam tanah untuk mencari makanan. Sedangkan pada tanaman apel yang berasal dari stek dan rundukan tunas akar, maka yang akan tumbuh dengan baik sebagai akar sebenarnya merupakan akar serabutnya atau akar cabang sehingga tidak mempunyai akar tunggang, akibatnya batangnya akan kurang kuat dan rentan terhadap kekurangan air dan unsur hara sebagai makanan tanaman (Soelarso, 1997).

Pohon apel memiliki batang berkayu keras dan cukup kuat. Cabang-cabangnya akan tumbuh lurus dan tidak memiliki ranting jika dibiarkan saja atau tidak dipangkas. Pohon apel juga memiliki kulit kayu yang tebal (Soelarso, 1997).

Daun apel dapat dibagi menjadi enam kategori, yakni *oval*, *broadly oval*, *narrow oval*, *acute*, *broadly acute* dan *narrow acute*. Permukaan daun apel

memiliki bentuk bias datar atau sedikit bergelombang. Ada sisi daun yang melipat kebawah dan ada juga sisi daun yang melipat ke bawah. Bulu-bulu halus umumnya menyelimuti bagian bawah daun apel (Untung, 1994).

Bunga apel mempunyai tangkai yang pendek, umumnya menghadap keatas, bertandan dan pada tiap tandannya ada 7 sampai 9 bunga. Penyerbukan silang terjadi pada bunga apel. Ada faktor yang mempengaruhi pembungaan pada bunga apel, yaitu temperatur, namun setiap varietas memberikan respon yang berbeda terhadap temperatur. Pada suhu antara 12°-18°C merupakan temperatur yang sesuai untuk pembungaan (Soelarso, 1997).

Buah apel terbagi menjadi 15 bagian, mulai dari kulit sampai bijinya. Setiap jenis tanaman apel memiliki 15 bagian itu dan bagiannya berbeda-beda. Namun, perbedaan yang paling mencolok dapat dilihat hanya di beberapa bagian saja seperti bentuk buah, warna kulit buah, benang sari, biji dan lekukan pada ujung buah. Ada 8 macam bentuk buah apel yaitu, flat, flat-round, round, round-conical, conical, long conical, oblong dan oblong-conical. Iklim dan tanah tempat dimana tanaman ini tumbuh merupakan faktor yang mempengaruhi bentuk buah tersebut. Bentuk bijinya juga berbeda. Ada yang berbentuk panjang dengan ujung meruncing, berujung tumpul, dan bentuk yang ketiga yaitu bentuk pertengahan antara bentuk yang pertama dan yang kedua. Warna buah tergantung dari varietasnya ada yang berwarna hijau kemerahan, hijau kekuning-kuningan, hijau berbintik-bintik dan sebagainya (Untung, 1994).

2.1.4 Kandungan Buah Apel

Buah apel memiliki kandungan berbagai macam senyawa kimia yang berguna sebagai penghambat pertumbuhan bakteri, terutama untuk mencegah terjadinya infeksi bakteri pada saluran makan diantaranya ada senyawa tannin, senyawa flavonoid (dalam apel disebut kuersetin), senyawa pektin dan vitamin C (Sufrida, 2006).

Dalam 100 gram buah apel mengandung : Energi : 58 kal; Protein : 0,3 gr; Lemak : 0,4 gr; Karbohidrat : 14,9 gr; Kalsium : 6 mg; Fosfor : 10 mg; Serat : 0,07 gr; Besi : 1,30 mg; Vit. A : 24 RE; Vit B1 : 0,04 mg; Vit B2 : 0,03 gr; Vit C : 5 mg; Niacin : 0,1 mg (Sufrida, 2006).

Menurut seorang peneliti senyawa tannin merupakan salah satu senyawa yang diperlukan dalam proses metabolisme tumbuhan. Meskipun senyawa tannin tidak digunakan sebagai fungsi primer metabolisme seperti pada biosintesis dan biodegradasi, senyawa tannin mempunyai aktivitas biologi yang sangat bervariasi, ada yang dapat bersifat toksik dan menyerupai hormon, serta ada kemungkinan yang berfungsi untuk melindungi pohon dari hewan herbivora atau umumnya sebagai protektan atau perlindungan tanaman dan melindungi tanaman dari penyakit (Hagerman, 2002).

Umumnya nama lain senyawa tannin yaitu asam tanat dan asam galotanat. Warna dari asam tanat dan asam galotanat yaitu ada yang tidak berwarna dan ada juga yang berwarna kuning atau coklat. Asam tanat memiliki berat molekul 1,701. Sembilan molekul asam galat dan molekul glukosa merupakan unsur yang menyebabkan terbentuknya senyawa tannin (Harborne, 1999). Istilah tannin sendiri berasal dari bahasa Celtic kuno yang berarti pohon oak. Pohon oak merupakan salah satu sumber tannin yang bisa digunakan sebagai proses pembuatan kulit (Harborne, *et al.*, 1999 ; Hagerman, 2002).

Tanaman apel pada umumnya memiliki kandungan senyawa tannin yang berkonsentrasi tinggi (Ikrawan, 2004). Berat molekul tannin antara 500-3000. Tanin merupakan zat fenol yang dapat larut dalam air. Tanin memberikan reaksi gugus fenol pada umumnya, yaitu dapat mengganggu sintesis RNA dan mendenaturasi protein (Hagerman, 2002).

Tannin merupakan senyawa aktif metabolit sekunder yang diketahui memiliki sejumlah khasiat yaitu sebagai anti diare, astringen, antioksidan dan anti bakteri. Senyawa tanin merupakan salah satu komponen zat organik yang sangat kompleks, yang terdiri dari senyawafenolik yang sedikit susah dipisahkan dan susah untuk mengkristal, mengendapkan protein dari larutannya dan bersenyawa dengan protein tersebut (Desmiaty, *et al.*, 2008). Tanin diklasifikasikan menjadi dua kelompok, yang pertama yaitu taninterhidrolisis dan yang kedua yaitu tanin terkondensasi. Tanin mempunyai peranan biologis yang cukup kompleks, yaitu mulai dari pengendap protein sampai dengan pengkhelat logam. Tanin juga dapat berfungsi sebagai antioksidan biologis (Hagerman, 2002).

Senyawa flavonoid adalah salah satu jenis senyawa yang memiliki sifat toksik atau aleopati. Senyawa ini merupakan senyawa yang termasuk dalam glukosida yang terdiri dari gula yang terikat dengan senyawa flavon serta merupakan senyawa golongan fenol yang dengan menggunakan cara mendenaturasi protein sel bakteri dapat berperan sebagai antibakteri (Rahardjo,2005).

Pada sebuah penelitian mengungkapkan adanya hasil bahwa apel kayaakan serat fitokimia dan flavonoid.Di Amerika Serikat pada sebuah Institut Kanker Nasional menyatakan bahwa, apel memiliki kandungan senyawa flavonoid paling banyak dibandingkan dengan buah-buahan lainnya.Selain itu, senyawa flavonoid ini dinilai dapat melindungi tubuh dari pengaruh radikal bebas dan polusi lingkungan (Sufrida, 2006).

Flavonoid merupakan kandungan khas yang dimiliki oleh tumbuhan hijau, senyawa ini terdapat hampir disemua bagian tanaman, yaitu meliputi :akar, daun, serbuk sari, kulit, bunga, biji, dan buah. Terbukti banyak peneliti yang menyimpulkan dan mendapatkan hasil bahwa apel memiliki kandungan senyawa flavonoid paling banyak bila dibandingkan dengan buah-buahan yang lain (Syamsuhidayat dan Hutapea, 1992).

Senyawa pektin juga tedapat di dalam buah apel.Pektin adalah senyawa polisakarida yang dapat larut dalam air dan memiliki peran sebagai antibakteri dan timbulnya luka (Rahardjo, 2005).Pektin atau serat alami bersifat melindungi tubuh yang terluka dari infeksi (Ikrawan, 2004).Pektin dapat mengikat asam empedu yang merupakan hasil metabolisme kolesterol sehingga dikenal juga sebagai antikolesterol.Semakin banyak kolesterol yang dimetabolisme, maka semakin banyak asam empedu yang berikatan dengan pektin dan terbuang keluar tubuh, sehingga akhirnya jumlah kolesterol akan menurun. Selain itu pektin juga memiliki beberapa peran penting, yaitu dapat menyerap kelebihan air dalam usus, memperlunak feces, serta mengikat dan menghilangkan toksik yang ada di dalamusus(Sufrida,2006).

Vitamin C merupakan antioksidan yang paling efektif untuk memblok atau menghambat terjadinya kerusakan akibat radikal bebas.Vitamin C bekerja dalam komponen air seperti pada sitoplasma.Vitamin C banyak terkandung

didalam sayuran dan buah-buahan, misalnya brokoli, tomat, jeruk, apel, pepaya, mangga, dan masih banyak yang lainnya (Hemila, 1994). Buah apel memiliki kandungan vitamin C yang merupakan antioksidan dan vitamin C mempunyai peran untuk meningkatkan kekebalan tubuh. Sari buah apel segar dan tidak teroksidasi sangat baik dikonsumsi atau dimanfaatkan untuk melawan berbagai serangan virus (Depkes, 2000). Vitamin C memiliki aktivitas antioksidan kurang lebih sekitar 4,7 atau setara dengan 1000 mg buah apel segar (Ikrawan, 2004). Apel mempunyai aktivitas antioksidan setara dengan vitamin C sebanyak 1500 mg (Rahardjo, 2005).

2.1.5 Manfaat Buah Apel

Manfaat buah apel sangat banyak ditemukan, adapun seorang pakar kesehatan yang menemukan bahwa buah apel bermanfaat untuk menurunkan kadar kolesterol, menstabilkan gula darah, menurunkan tekanan darah, membunuh virus, menurunkan nafsu makan, meningkatkan HDL, mempertahankan kesehatan urat saraf, memperlancar pencernaan, sebagai obat jantung yang baik dan antikanker. Disamping banyaknya senyawa-senyawa dan zat-zat gizi yang terkandung didalam apel tersebut, rahasia apel sehingga apel dapat mencegah penyakit terletak pada kandungan senyawa karoten dan senyawa pektinnya yang disebut-sebut sebagai serat yang larut di dalam air. Senyawa karoten mempunyai aktivitas sebagai vitamin A dan juga sebagai antioksidan yang bermanfaat untuk menangkal serangan radikal bebas penyebab berbagai penyakit degeneratif (Heming, 1992).

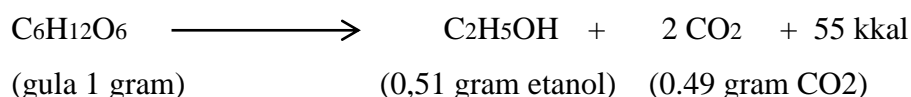
2.2 Tinjauan Tentang Cuka Apel

Cuka buah adalah salah satu produk olahan pangan fermentasi yang dapat dimanfaatkan untuk pengawet, hal ini bisa terjadi karena adanya kandungan asam asetat pada cuka buah yang memiliki sifat sebagai antimikroorganisme. Prinsipnya cuka fermentasi terbuat dari cairan fermentasi yang dihasilkan oleh aktifitas mikroorganisme pada jaringan-jaringan yang berkarbohidrat pada saat proses pendiaman atau disebut dengan proses fermentasi. Jenis buah-buahan yang dapat dijadikan cuka seperti apel, pisang, anggur, dan buah-buahan lainnya

yang mengandung alkohol dan gula (Orey, 2008). Selain itu, cuka buah juga dapat dimanfaatkan sebagai pangan fungsional. Hal ini disebabkan karena pangan fungsional tidak hanya memiliki fungsi primer. Fungsi yang lainnya adalah untuk mencukupi kebutuhan dasar manusia yaitu karbohidrat, lemak, protein, mineral, dan vitamin. Fungsi sekunder ini sebagai pangan dapat diterima oleh indrawi manusia, memiliki tampilan dan cita rasa yang baik. Kemudian cuka juga memiliki fungsi tersier yaitu sebagai pencegahan atau meminimalkan terjadinya suatu penyakit dengan memanfaatkan kandungan senyawa yang ada di dalam cuka (Nugraheni, 2011).

Cuka terbuat dari hampir seluruh sumber karbohidrat yang terfermentasi, termasuk pada anggur, sirup gula, sorghum, apel, pir, melon, kelapa, bir, madu, dan lainnya. Cuka apel sendiri adalah produk olahan yang terbuat dari sari buah apel yang dihasilkan dengan cara dua proses fermentasi, yaitu fermentasi alkohol yang mengubah glukosa di dalam buah menjadi etanol. Etanol dihasilkan akibat adanya aktifitas mikroorganisme, biasanya oleh *Sacharomyces cerevisiae*. Dan fermentasi asetat, proses fermentasi ini akan mengoksidasi etanol menjadi asam asetat oleh mikroorganisme kelompok *Acetobacter*. Kedua macam fermentasi ini sangat berbeda satu sama lain, dan bagian pertama atau yang dimaksud adalah fermentasi pertama harus diselesaikan terlebih dahulu sebelum tahap selanjutnya dimulai.

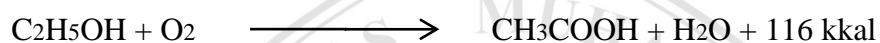
Yang pertama yaitu proses fermentasi alkohol. Sel mikroorganisme yang merupakan spesies dari *Sacharomyces cerevisiae* akan bekerja dalam kondisi aerobik. Mikroorganisme ini akan memfermentasi glukosa yang ada dalam sari buah dan diubah menjadi etanol. Untuk setiap 180 gram glukosa yang melalui fermentasi ini akan menghasilkan 92 gram etanol, 80 gram CO₂, dan energi (ATP) maka dapat disebutkan secara teoritis setiap 1 gram glukosa akan didapatkan sekitar 0.51 gram etanol dan 0.49 gram CO₂.



Suhu maksimal sel mikroorganisme untuk menghasilkan etanol secara efisien pada saat proses fermentasi adalah 28-35°C dengan pH 3,3-6. Tetapi, bisa

jugapada tahap fermentasi ini dilakukan dengan tidak memperhatikan pengaturan suhu.

Proses yang kedua yaitu fermentasi asam asetat. Setelah proses fermentasi alkohol dilakukan secara sempurna, langkah berikutnya yaitu proses fermentasi asam asetat. Mikroorganisme yang digunakan adalah *Acetobacter* dan *Aspergillus aceti*. Mikroorganisme ini akan mengoksidasi alkohol yang dihasilkan dari proses fermentasi pertama menjadi asam asetat dan air. Proses fermentasi asam asetat ini berbeda dengan proses fermentasi alkohol yang dilakukan dalam kondisi anaerob. Untuk pertumbuhan dan aktivitas mikroorganisme fermentasi asam asetat ini dilakukan pada kondisi aerob. Proses fermentasi asam asetat ditampilkan pada reaksi berikut :



(Karim, 2011)

2.3 Tinjauan Tentang Radikal Bebas

Secara biokimia, oksidasi adalah proses pelepasan elektron dari suatu senyawa. Sedangkan reduksi adalah proses penangkapan elektron. Senyawa yang bisa memberikan atau melepaskan elektron disebut reduktor atau reduktan, sedangkan senyawa yang bisa menerima atau menarik elektron disebut oksidator atau oksidan (Winarsi, 2007).

Radikal bebas merupakan atom atau molekul yang memiliki sifat yang tidak stabil dan sangat reaktif, karena radikal bebas mengandung satu bahkan lebih elektron yang tidak berpasangan. Molekul radikal bebas akan bereaksi dengan molekul disekitarnya agar lebih stabil dengan cara menarik atau menerima elektron. Radikal bebas dan molekul lain akan bereaksi dan dapat berlangsung secara berkesinambungan dan menimbulkan reaksi berantai. Jika berlangsung secara terus menerus maka akan menimbulkan adanya gangguan kesehatan seperti kanker, jantung, penuaan dini dan penyakit degeneratif lainnya (Antolovich, *et al.*, 2002).

Adapun menurut penulis lain, beliau mendefinisikan bahwa radikal bebas merupakan sebuah atom, molekul atau bahkan senyawa yang dapat berdiri sendiri yang memiliki elektron yang tidak berpasangan, maka dari itu memiliki sifat

yang sangat reaktif dan tidak stabil. Kemudian elektron yang tidak berpasangan akan selalu berusaha untuk mencari pasangan, sehingga mudah bereaksi dengan molekul atau zat yang lain seperti protein, lemak maupun DNA di dalam tubuh (Winarti, 2010).

Kerusakan oksidatif merupakan kerusakan akibat radikal bebas, pada dasarnya dapat diminimalkan oleh senyawa endogen, yaitu oleh antioksidan yang secara alami sudah ada di dalam tubuh. Namun jika di dalam tubuh jumlah radikal bebas melebihi batas kemampuan proteksi antioksidan endogen, maka akan dibutuhkan antioksidan yang bersumber dari luar tubuh untuk membantu sistem pertahanan tubuh terhadap radikal bebas (Birben, *et al.*, 2012).

Tubuh manusia mempunyai molekul oksigen yang bersifat stabil dan tidak stabil. Molekul oksigen yang bersifat stabil memiliki peran penting untuk memelihara kehidupan sel. Sebenarnya dalam jumlah tertentu radikal bebas diperlukan untuk kesehatan juga, akan tetapi radikal bebas memiliki sifat merusak dan sangat berbahaya, jadi mungkin sangat beresiko jika digunakan. Radikal bebas memiliki fungsi di dalam tubuh. Fungsi tersebut adalah untuk melawan radang, membunuh bakteri dan mengatur tonus otot polos dalam organ dan pembuluh darah (Giriwijoyo, 2004).

Radikal bebas dapat menyebabkan kerusakan sel dengan tiga cara yaitu :

1. Peroksidasi komponen lipid dari membran sel dan sitosol. Menyebabkan otokatalisis atau serangkaian reduksi asam lemak yang dapat mengakibatkan kerusakan membran serta organel sel.
2. Kerusakan DNA, kerusakan DNA ini dapat mengakibatkan terjadinya mutasi DNA bahkan menimbulkan kematian sel.
3. Modifikasi protein teroksidasi karena terbentuknya *cross linking* protein, melalui mediator sulfidril atas beberapa asam amino yang bersifat labil seperti sistein, metionin, lisin dan histidin (Kumar *et al.*, 2005; Eberhardt, 2001).

Pembentukan radikal bebas yang terjadi secara terus menerus di dalam tubuh terjadi melalui proses metabolisme sel normal, kekurangan nutrisi, proses peradangan, maupun sebagai respons adanya radiasi sinar gamma dan ultraviolet (UV), polusi lingkungan seperti asap rokok maupun asap kendaraan (Wijaya, 1996). Adapun faktor yang dapat menyebabkan munculnya radikal bebas di dalam

tubuh antara lain yaitu asap mobil, sinar X, bahan kimia dalam makanan seperti pengawet, residu pestisida, pewarna sintetik, dan bahan tambahan makanan lainnya, kemudian bahan kimia termasuk obat-obatan. Kebiasaan melakukan diet atau membiasakan membentuk pola makan tersendiri juga dapat menyebabkan terbentuknya radikal bebas (Winarti, 2010).

Kerusakan bahan pangan juga bisa disebabkan karena radikal bebas. Kerusakan yang terjadi yaitu kehilangan nutrisi, perubahan parameter utama bahan makanan seperti aroma, tekstur, rasa, konsistensi dan tampilan. Radikal bebas yang memiliki sifat reaktif jika tidak diinaktifkan maka akan dapat merusak makromolekul pembentuk sel seperti karbohidrat, protein, asam nukleat, dan lemak, sehingga hal tersebut dapat menyebabkan timbulnya penyakit degeneratif (Mohamed, *et al.*, 2008). Radikal bebas yang bereaksi dengan komponen biologis akan menghasilkan senyawa teroksidasi. Senyawa tersebut dapat digunakan sebagai penanda terjadinya kerusakan oksidatif. Komponen endogen yang dapat diserang oleh radikal bebas yaitu lipid, protein dan DNA (Lampe, 1999; Wijaya, 1996).

2.4 Tinjauan Tentang Antioksidan

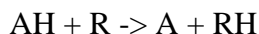
Antioksidan merupakan senyawa yang memberikan elektronnya, yang memiliki berat molekul kecil namun dapat meninaktivasi dan memblok atau menghambat proses oksidasi yang mengikat radikal bebas. Pada tubuh manusia dapat menghasilkan antioksidan secara alami, tetapi jika jumlah radikal bebas bertambah atau melebihi batas normal kemampuan tubuh memproteksi, maka antioksidan yang dihasilkan tubuh tidak akan mampu mengikat radikal bebas yang berlebih tersebut dan akhirnya akan terjadi stress oksidatif (Winarsi, 2007).

Radikal bebas dihambat melalui 3 cara, yaitu :

- a) Menghambat atau mencegah pembentukan radikal bebas yang baru.
- b) Menangkap atau menaktifasi radikal dan memotong propagasi atau pemutusan reaksi berantai.
- c) Memperbaiki kerusakan yang diakibatkan oleh radikal bebas (Winarsi, 2007).

Berdasarkan mekanisme kerja, antioksidan digolongkan menjadi antioksidan primer dan antioksidan sekunder.

- a) Antioksidan primer bekerja dengan memberikan ion hidrogen atau elektronnya pada radikal bebas dan memutus rantai reaksi dengan mengubahnya menjadi lebih stabil. Selain memberikan ion hidrogen, antioksidan primer akan membentuk kompleks lipid antioksidan, karena antioksidan bereaksi dengan lipid radikal bebas.



(Antioksidan memberikan ion hidrogen pada lipid radikal bebas)

Senyawa-senyawa yang termasuk kedalam golongan antioksidan primer adalah kelompok asam askorbat (vitamin C), senyawa polifenol, BHA, TBHQ, BHT, PG, dan tokoferol.

- b) Antioksidan sekunder kerjanya dengan mencegah atau menghambat terbentuknya radikal bebas dengan menyerap radiasi sinar ultraviolet, menginaktivasi singlet oksigen, serta bekerja sinergis dengan antioksidan primer. Senyawa-senyawa yang termasuk kedalam golongan antioksidan sekunder adalah dilauril, distearil ester, dan asam triodipropionat (Arcan, 2005).

2.4.1 Pengertian Antioksidan

Antioksidan adalah senyawa yang dapat memblok atau menghambat proses oksidasi radikal bebas. Caranya dengan menyumbangkan pasangan elektronnya. Reaksi oksidasi didefinisikan sebagai suatu reaksi kimia yang memberikan elektron dari suatu zat ke oksidator, reaksi ini dapat membentuk radikal bebas dan memicu reaksi berantai sehingga dapat menyebabkan kerusakan pada sel tubuh. Antioksidan berperan sebagai mekanisme pertahanan di dalam tubuh terhadap radikal bebas, yang beberapa diantaranya telah terdapat di dalam tubuh secara alami. Antioksidan yang secara alami terbentuk didalam tubuh seperti glutathione peroksidase (GPx), superoksida dismutase (SOD), glutathione-S-transferase (GST). Dan katalase (CAT). Tetapi, jika pengaruh pembentukan radikal bebas terus meningkat dari faktor eksternal, sistem pertahanan tubuh akan menjadi kurang efektif sehingga dibutuhkan asupan antioksidan dari luar juga. Antioksidan yang memiliki sifat non-esensial seperti β -karoten, α -tokoferol,

flavonoid, dan vitamin C dapat diperoleh dari berbagai jenis sayur dan buah-buahan (Widowati, *et al.*, 2005).

2.4.2 Klasifikasi Antioksidan

Antioksidan dapat diklasifikasikan menjadi dua secara umum, yaitu antioksidan alami dan antioksidan sintetis. Antioksidan alami banyak ditemukan pada tumbuhan seperti sayuran dan buah-buahan. Karena dinilai lebih aman dan mempunyai efek samping terhadap tubuh yang lebih sedikit maka antioksidan alami lebih banyak dipilih daripada antioksidan sintetis. Antioksidan sintetis adalah senyawa antioksidan yang dihasilkan dari reaksi kimia. Jenis antioksidan sintesis yang banyak digunakan yaitu butil hidroksi anisol (BHA), butil hidroksi toluen (BHT), propil galat (PG), dan ter-butil hidrokuinon (TBHQ) (Sing, 2007).

2.4.3 Mekanisme Kerja Antioksidan

Pada dasarnya, antioksidan memiliki peran untuk menghentikan reaksi berantai senyawa radikal bebas melalui mekanisme penangkapan radikal bebas. Caranya yaitu dengan memberikan satu elektron agar dapat berpasangan dengan elektron bebas dari senyawa radikal sehingga menjadi non-radikal (Rohmatussolihat, 2009). Mekanisme penangkapan radikal bebas oleh antioksidan dapat dibedakan menjadi 2, yaitu mekanisme enzimatik dan non-enzimatik. Antioksidan yang kerjanya secara enzimatik antara lain katalase, superoksida dismutase, glutathion peroksidase, dan glutathion reduktase. Secara non-enzimatik, antioksidan dapat bekerja melalui berbagai mekanisme antara lain:

- a) Menghambat dan menangkap pembentukan radikal bebas hasil dari proses peroksidase lipid seperti vitamin C, vitamin E dan β -karoten
- b) Pengkelat logam, yaitu EDTA
- c) Kofaktor enzim antioksidan, misalnya glutathion sebagai kofaktor enzim glutathion peroksidase dan transferase (Birben, *et al.*, 2012).

Antioksidan bekerja dengan dua cara, pertama antioksidan berfungsi sebagai pemberi atom hidrogen dan disebut sebagai antioksidan primer. Senyawa ini akan memberikan atom hidrogennya ke radikal lipid secara cepat sehingga memiliki keadaan yang lebih stabil dari sebelumnya. Kemudian cara kerja

antioksidan yang kedua disebut antioksidan sekunder yang dapat memperlambat laju autooksidasi dengan berbagai mekanisme di luar mekanisme pemutusan reaksi berantai (Rohmatussolihat, 2009).

Mekanisme antioksidan dalam memblokir atau menghambat oksidasi atau menghentikan reaksi berantai pada radikal bebas dari lipid yang teroksidasi dapat disebabkan oleh 4 macam reaksi, yaitu : (1) pelepasan hidrogen dari antioksidan, (2) penambahan lemak ke dalam cincin aromatik pada antioksidan, (3) pelepasan elektron dari antioksidan, (4) pembentukan senyawa kompleks antara lemak dan cincin aromatik dari antioksidan (Ketaren, 1986).

2.4.4 Kelompok senyawa antioksidan

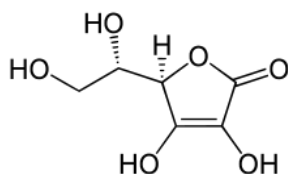
Berdasarkan sumbernya antioksidan dibagi dalam dua kelompok, yaitu antioksidan alami (antioksidan hasil ekstraksi bahan alami) dan antioksidan sintetik (antioksidan yang diperoleh dari hasil sintesa reaksi kimia). Ada beberapa antioksidan sintetik yang diizinkan digunakan secara luas diseluruh dunia sebagai bahan dalam makanan, yaitu Tert-Butylated Hidroxyquinon (TBHQ), Butylated Hidroxytoluene (BHT), Butylated Hidroxyanisol (BHA), dan tokoferol. Antioksidan sintetik tersebut adalah antioksidan yang telah diproduksi secara sintesis untuk tujuan komersial (Buck, 1991).

Ada beberapa antioksidan sintetik yang lebih umum sering digunakan, yaitu senyawa fenolik seperti butylhydroquinone tersier (TBHQ), butylated hydroxyanisol (BHA), terbutilasi hidroksi - toluena (BHT), dan senyawa ester dari asam galat, contohnya seperti gallate propil (PG). Antioksidan fenolik sintesis selalu diganti oleh senyawa alkil untuk meningkatkan kemampuan kelarutannya dalam minyak dan lemak (Gordon et al, 2001).

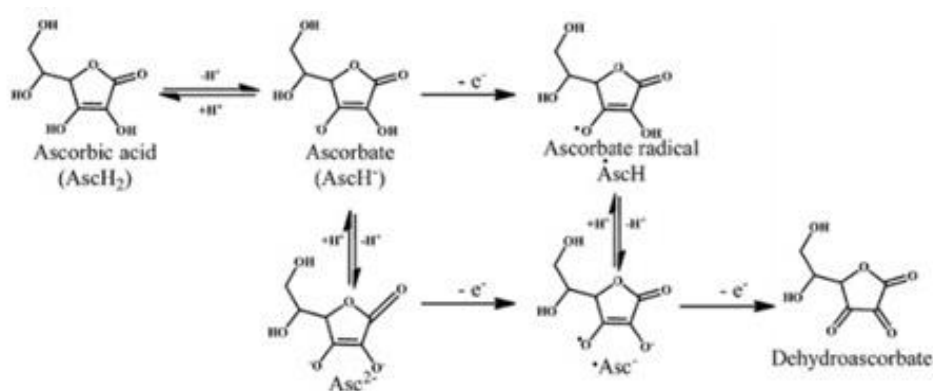
Antioksidan alami bisa juga bersumber dari bahan pangan, diantaranya yaitu seperti buah-buahan, rempah-rempah, sayur-sayuran, kakao, teh, sereal, biji-bijian, dan tumbuhan alga yang tumbuh di laut dan di air tawar (Shui, 2004). Bahan-bahan tersebut memiliki kandungan jenis senyawa yang mempunyai aktivitas antioksidan, seperti flavonoid, asam-asam amino, karotenoid, asam askorbat, golongan tokoferol, peptide, tannin, melanoidin, asam-asam organik, dan produk-produk reduksi lainnya (Pratta, 1992, di dalam Trilaksani, 2003).

2.4.5 Vitamin C

Vitamin C mempunyai nama lain asam askorbat, senyawa ini merupakan senyawa kimia yang larut dalam air. Ascorbyl palmitate merupakan asam askorbat yang berikatan dengan asam lemak untuk membuat sistem pengantar yang dapat larut di dalam lemak untuk vitamin C (Perricone, 2002).



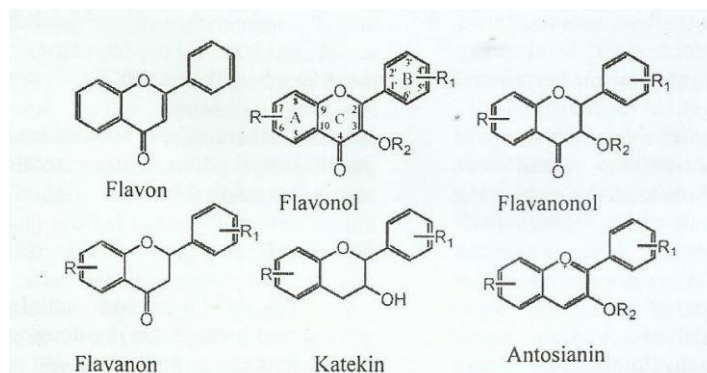
Gambar 2.2 Struktur Kimia Vitamin C



Gambar 2.3 Mekanisme Vitamin C sebagai Antioksidan

2.4.6 Flavonoid Sebagai Antioksidan

Senyawa flavonoid memiliki kelompok golongan senyawa yang sangat banyak dan banyak ragamnya dari senyawa fenolik yang diperoleh dari tumbuhan tingkat tinggi. Senyawa aromatik ini dibentuk dalam tumbuhan dari asam amino aromatik (fenilalanin dan tirosin) dan beberapa unit asetat. Pola substitusi dan keadaan oksidasi yang sangat beragam dapat ditunjukkan oleh senyawa flavonoid, yang di klasifikasikan menjadi : flavon, flavonol, flavanon, flavanonol, antosianin, dan katekin (Harborne, 1988 dalam Junaidi, 2007).



Gambar 2.4 Struktur Kimia Flavonoid

2.5 Tinjauan Tentang Pengujian Antioksidan

2.5.1 Tinjauan Tentang ABTS

Metode ABTS (2,2-azinobis-(3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonic Acid) merupakan salah satu metode yang secara langsung mengukur *antioksidan* dalam bahan alam. Metode ABTS memiliki kelebihan dibandingkan dengan metode lain, yaitu pengujian sederhana, mudah diulang, menggunakan alat yang sederhana serta tidak menggunakan alat khusus untuk menghitung total antioksidan (Yu, 2008). Asam 2,2'-Azinobis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfonat (ABTS) merupakan substrat dari peroksidase, bila dioksidasi dengan H_2O_2 membentuk senyawa radikal kation metastabil dengan karakteristik menunjukkan absorbansi kuat pada panjang gelombang 414 nm. Namun, ada maksimal penyerapan sekunder di daerah dengan panjang gelombang 645, 734 dan 815 nm. ABTS merupakan senyawa larut air dan stabil secara kimia. Akumulasi dari ABTS dapat dihambat oleh antioksidan pada medium reaksi dengan aktivitas yang bergantung waktu reaksi dan jumlah antioksidan (Antolovich, 2002). Metode ABTS adalah metode yang digunakan untuk melihat aktivitas antioksidan. ABTS adalah substrat peroksidase yang stabil dan larut air, apabila dioksidasi oleh H_2O_2 akan membentuk senyawa radikal kation yang tidak stabil. Prinsip metode ini adalah dengan menggunakan antioksidan dalam jumlah tertentu untuk menghambat ABTS. Kemampuan antioksidan dalam menghambat ABTS ini yang dapat diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 734 nm. Dari hasil spektrofotometer dapat diketahui aktivitas yang terdapat pada antioksidan (Ozgen, *et al.*, 2006).

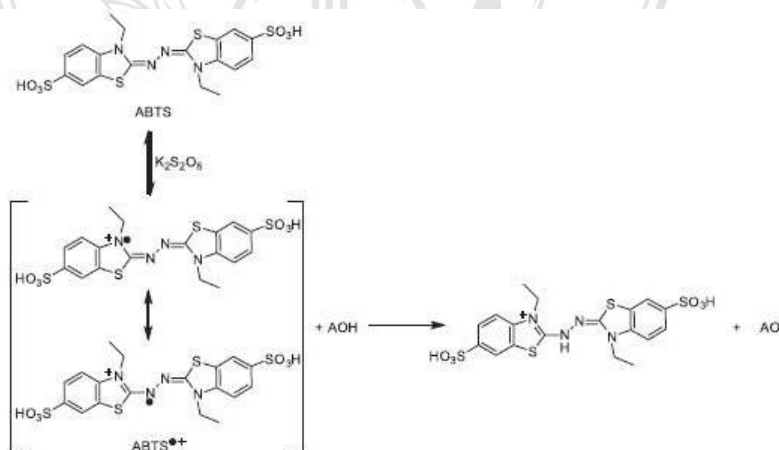
2.5.2 Tinjauan Tentang ORAC

Kapasitas serapan radikal Oksigen (ORAC) adalah metode lain yang digunakan untuk mengukur kapasitas antioksidan secara *in vitro*. Metode ini menggunakan senyawa azo, seperti 2,2'-azobis (2-amidino propana) dihidroklorida (AAPH). Metode ORAC secara biologis menggunakan radikal bebas yang relevan, menyatukan waktu dan derajat Aktivitas antioksidan menjadi satu nilai data, dan itu mudah beradaptasi dengan sistem *assay high-throughput*. Keuntungan dari metode ORAC adalah kemampuannya untuk menguji antioksidan hidrofilik dan lipofilik, sehingga akan menghasilkan

pengukuran yang lebih baik dari total aktivitas antioksidan (Prior,*et al.*, 2003). Analisis dilakukan pada buffer fosfat pH 7,4 pada suhu 37 °C. Radikal peroksil dihasilkan dengan menggunakan dihidroklorida 2, 2'-azobis (2-amidino-propana) yang disiapkan segar untuk setiap larva. Fluorescein digunakan sebagai substrat. Kondisi fluoresensi adalah sebagai berikut: eksitasi pada 485 nm dan emisi pada suhu 520 nm. Kurva standar linier antara 0 dan 50 mM Trolox. Hasilnya dinyatakan sebagai mM TE / g massa segar (Thaipong,*et al.*, 2006). Kerugian utama teknik ORAC adalah diperlukan penggunaan peralatan yang mahal (Awika,*et al.*, 2003).

2.5.3 Tinjauan Tentang TRAP

Pengujian TRAP atau (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter method) bekerja berdasarkan pengukuran konsumsi oksigen selama reaksi oksidasi lipid terkontrol yang diinduksi oleh dekomposisi termal dari AAPH (2,2-Azobis (2-aminidopropana) hidroklorida) untuk mengukur total aktivitas antioksidan. Hasil uji diekspresikan sebagai jumlah (dalam mikromol) radikal peroksil yang terperangkap oleh 1 liter plasma. Pengukuran serum TRAP berdasarkan penentuap lamanya waktu yang diperlukan oleh serum uji untuk dapat bertahan dari oksidasi buatan (Antolovich, *et al*, 2002).



Gambar 2.5 Mekanisme Kerja ABTS

2.5.4 Tinjauan Tentang FRAP

Metode FRAP (*Ferric Reducing/Antioxidant Power method*) bekerja berdasarkan reduksi dari analog ferroin, kompleks Fe^{3+} dan tripiridiltriazin $\text{Fe}(\text{TPTZ})^{3+}$ menjadi kompleks $\text{Fe}^{2+} \text{Fe}(\text{TPTZ})^{2+}$ yang berwarna biru intensif oleh antioksidan pada suasana asam. Hasil pengujian diinterpretasikan dengan peningkatan absorbansi pada panjang gelombang 593 nm dapat disimpulkan sebagai jumlah Fe (dalam molekular) ekuivalen dengan antioksidan standar (Antolovich, *et al.*, 2002).

2.5.5 Tinjauan Tentang DPPH

DPPH merupakan radikal bebas yang stabil pada suhu kamar dan sering digunakan untuk mengevaluasi aktivitas antioksidan beberapa senyawa atau ekstrak bahan alam. DPPH menerima elektron atau radikal hidrogen akan membentuk molekul diamagnetik yang stabil. Interaksi antioksidan dengan DPPH baik secara transfer elektron atau radikal hidrogen pada DPPH, akan menetralkan radikal bebas dari DPPH dan membentuk DPPH tereduksi. Jika semua elektron pada radikal bebas DPPH menjadi berpasangan, maka warna larutan berubah dari ungu tua menjadi kuning terang dan absorbansi pada panjang gelombang 517 nm akan hilang. Perubahan ini dapat diukur sesuai dengan jumlah elektron atau atom hidrogen yang ditangkap oleh molekul DPPH akibat adanya zat reduktor (Molyneux, 2004).

Uji DPPH secara teknis sederhana dan cepat dan hanya membutuhkan spektrofotometer UV-VIS yang digunakan secara luas dalam skrining antioksidan. Analisis sejumlah besar sampel bisa dilakukan dengan menggunakan microplates (Karadag, *et al.*, 2009).

Disamping banyaknya kelebihan menggunakan metode DPPH ini juga memiliki kelemahan yaitu hanya dapat dilarutkan dalam media organik (terutama media alkoholik), tidak pada media *aqueous* sehingga membatasi kemampuannya dalam penentuan peran antioksidan hidrofilik (Arnao, 2000).

2.6 Tinjauan Tentang Pengujian Spektrofotometri UV-VIS

Spektrofotometri sesuai dengan namanya adalah alat yang terdiri dari spektrometer dan fotometer. Spektrofotometer menghasilkan sinar dari spectrum dengan panjang gelombang tertentu dan fotometer adalah alat pengukur intensitas cahaya yang ditransmisikan atau diabsorpsi. Jadi spektrofotometer digunakan untuk mengukur energi relatif jika energi tersebut ditransmisikan, direfleksikan atau diemisikan sebagai fungsi panjang gelombang. Kelebihan spektrofotometer dengan fotometer adalah panjang gelombang dari sinar putih dapat lebih di deteksi dan cara ini diperoleh dengan alat pengurai seperti prisma, grating atau celah optis. Pada fotometer filter dari berbagai warna yang mempunyai spesifikasi melewati trayek pada panjang gelombang tertentu. Spektrofotometri UV-Vis termasuk salah satu metode analisis instrumental yang frekuensi penggunaannya paling banyak dalam laboratorium analisis. Sinar ultraviolet mempunyai panjang gelombang antara 200-400 nm, sementara sinar tampak (*visible*) mempunyai panjang gelombang antara 400-750 nm. Warna sinar tampak dapat dihubungkan dengan panjang gelombangnya (Gandjar dan Rohman, 2007).

Spektrofotometer UV-Vis menjadi suatu metode analisis farmasetika yang sangat populer untuk pengukuran secara kuantitatif obat dan metabolit dalam sampel biologi karena metodenya yang cepat, simpel, dan sensitif. Identifikasi kualitatif dari obat atau metabolit menggunakan spektrofotometri UV-Vis berdasarkan pada panjang gelombang maksimum. Spektrofotometri merupakan metode relatif (bukan metode absolut), artinya perlu senyawa baku sebagai pembanding. Radiasi di daerah UV/*Visibel* diserap melalui eksitasi elektron-elektron yang terlibat dalam ikatan-ikatan antara atom-atom pembentuk molekul sehingga awan elektron menahan atom-atom bersama-sama mendistribusikan kembali atom-atom itu sendiri dan orbital yang ditempati oleh elektron-elektron pengikat tidak lagi bertumpang tindih (Watson, 2007).